



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

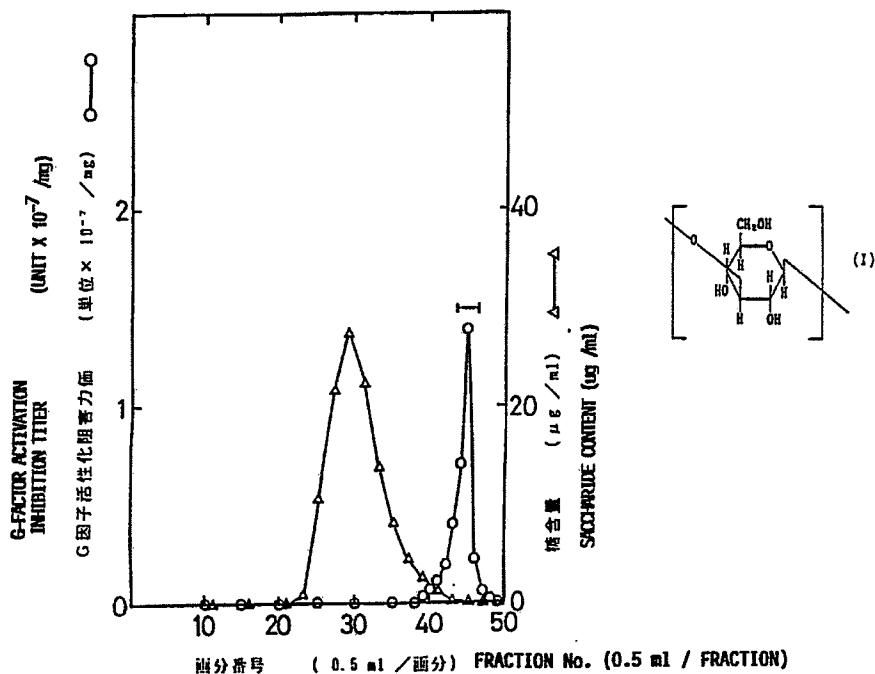
(51) 国際特許分類 <sup>4</sup> G01N 33/579	A1	(11) 国際公開番号 WO 90/02951
		(43) 国際公開日 1990年3月22日(22.03.90)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP89/00903          (22) 国際出願日 1989年9月1日 (01. 09. 89)</p> <p>(30) 優先権データ          特願昭63-216341 1988年9月1日 (01. 09. 88) JP</p> <p>(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について)          生化学工業株式会社 (SEIKAGAKU KOGYO CO., LTD.) (JP/JP)          〒103 東京都中央区日本橋本町二丁目1番5号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および          (75) 発明者/出願人(米国についてのみ)          田中重則 (TANAKA, Shigenori) (JP/JP)          〒173 東京都板橋区板橋1-49-14 Tokyo, (JP)          明田川純 (AKETAGAWA, Jun) (JP/JP)          〒190 東京都立川市幸町4-52-1 幸町団地9-205          Tokyo, (JP)          大木 誠 (OHKI, Makoto) (JP/JP)          〒185 東京都国分寺市西町4-17-3 第2コーコ白菊101          Tokyo, (JP)          高橋昭治 (TAKAHASHI, Shoji) (JP/JP)          〒189 東京都東大和市南街2-51-4 Tokyo, (JP)</p> <p>田村弘志 (TAMURA, Hiroshi) (JP/JP)          〒189 東京都東大和市立野3-1293-10 グリーンタウン2-408          Tokyo, (JP)          柴田有康 (SHIBATA, Yuko) (JP/JP)          〒164 東京都中野区中野5-3-9 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人          弁理士 小田島平吉, 外 (ODAJIMA, Heikichi et al.)          〒107 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自動車会館          小田島特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国          AU, BE (欧洲特許), CH (欧洲特許), DE (欧洲特許),          FR (欧洲特許), GB (欧洲特許), IT (欧洲特許), JP, KR,          NL (欧洲特許), SE (欧洲特許), US.</p>		

国際調査報告書

添付公開書類

(54) Title: LIMULUS AMOEBOCYTE LYSATE G-FACTOR ACTIVATION

(54) 発明の名称 カブトガニ・アメボサイト・ライセート G因子活性化阻害剤

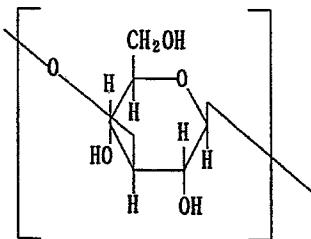


(57) Abstract

This invention relates to a limulus amoebocyte lysate G-factor activation inhibitor which contains as an active ingredient a polyglycoside having at least one poly-(1 → 3)-β-D-glucoside structure comprising 2 to 370 consecutive (1 → 3)-β-D-glucoside units represented by formula (I). This inhibitor is effective in inhibiting the activation of a G-factor which may be present in limulus amoebocyte lysate to be used in the Limulus test.

(57) 要約

本発明は、式



で示される (1 → 3) - β - D - グルコシド構造単位が連続して 2 ~ 3  
70 個結合したポリ - (1 → 3) - β - D - グルコシド構造部分を少な  
くとも 1 つ含有するポリグリコシドを有効成分とするカブトガニ・アメ  
ボサイト・ライセート G 因子活性化阻害剤に関し、該阻害剤はリムルス  
テストに使用されるカブトガニ・アメボサイト・ライセート中に存在し  
うる G 因子の活性化を阻害するのに有用である。

情報としての用途のみ  
PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	ES スペイン	MG マダガスカル
AU オーストラリア	FI フィンランド	ML マリー
BB バルバードス	FR フランス	MR モーリタニア
BE ベルギー	GA ガボン	MW マラウイ
BF ブルキナ・ファソ	GB イギリス	NL オランダ
BG ブルガリア	HU ハンガリー	NO ノルウェー
BJ ベナン	IT イタリー	RO ルーマニア
BR ブラジル	JP 日本	SD スーダン
CA カナダ	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SE スウェーデン
CF 中央アフリカ共和国	KR 大韓民国	SN セネガル
CG コンゴー	LI リヒテンシュタイン	SU ソビエト連邦
CH スイス	LK スリランカ	TD チャード
CM カメルーン	LU ルクセンブルグ	TG トーゴ
DE 西ドイツ	MC モナコ	US 米国
DK デンマーク		

## 明細書

## カブトガニ・アメボサイト・ライセートG因子活性化阻害剤

## 技術分野

本発明は或る種の酵素前駆体の活性化を阻害する薬剤に関し、さらに  
5 詳しくは、カブトガニ・アメボサイト・ライセートの凝固系に関与する  
因子のうち、(1→3)- $\beta$ -D-グルカンとの反応により凝固が開始  
する系の(1→3)- $\beta$ -D-グルカン感受性因子すなわちG因子の活  
性化を阻害する物質、すなわちG因子活性化阻害剤に関する。

## 背景技術

10 カブトガニ・アメボサイト・ライセート(Horseshoe crab Amebocyte Lysate-以下、LALと略記することがある)が、1964年LevinとBangによりグラム陰性細菌の毒素(エンドトキシン)で直ちに凝  
固(ゲル化)するという現象が発見されて[J. Levin and F.B.Bang(1964)Bull. Johns Hopkins Hosp., 115, 265-274]以来、LALはエンドトキシン(細菌内毒素)の特異的検出測定法、  
15 いわゆる「リムルステスト」(Limulus Test)試薬として広く利用さ  
れている。カブトガニの現存種は3属4種でLimulus polyphemus、Tachypleus tridentatus、T.gigas及びCarcinoscorpius rotundicaudaが知られており、中でも北米産のL. polyphemus、日本、中国産のT. tridentatusのアメボサイトライセートを用いる「リムルステスト」試薬  
20 の商品化が行なわれている。[例えば、Progress in Clinical and Biological Research; volume 93, Endotoxins and their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test, Stanley W. Watson, Jack Levin and Thomas J. Novitsky, Ed

itors: Published in 1982 by Alan R. Liss, Inc. page  
7 - 24, Title: The Limulus Test and Bacterial Endo  
toxins: Some Perspectives by J. Levin参照】。

LALは当初エンドトキシンのみに特異的に反応すると考えられてい  
5 たが、最近の研究で、LALはエンドトキシンと同様に(1→3)- $\beta$ -D  
-グルカンとも反応することが判明した。LALの凝固系は、哺乳動物  
の血液凝固系と同様に、複数の凝固因子の段階的反応による系からなり、  
エンドトキシンにより反応開始する系(C因子活性化系)の他に、(1  
→3)- $\beta$ -D-グルカンによって反応開始する系(G因子活性化系)  
10 も存在することが確認されている [T.Morita et al. (1981) F  
EBS LETTERS, 129, 318-321及びS.Iwanaga et  
al. (1986) J.Protein Chem., 5, 255-268]。そのため、リムルステストをできるだけエンドトキシン特異的にするための  
研究が行なわれており、例えば、T.Obayashi et al. (1985) C1  
15 in., Chim. Acta, 149, 55-65には、LALの凝固因子の分画-  
再構成によりG因子を分離除去した試薬を用いたエンドトキシンの測定  
法が提案されており、これによるエンドトキシン特異的測定キットが生  
化学工業(株)より「エンドスペシー」なる商品名で販売されている。

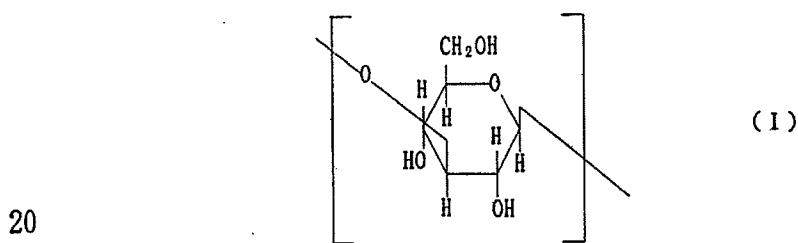
しかし、上記提案の測定法はエンドトキシンに特異的な検出測定法と  
20 しては極めて強い要求があるが、複数の凝固系因子からなるカブトガニ・  
アメボサイト・ライセートからG因子を分離除去することは、①エンド  
トキシンや(1→3)- $\beta$ -D-グルカンの不在下で各因子の分画操作  
を行う必要があり、このために用いる器具、装置、薬剤に対するエンド  
トキシンや(1→3)- $\beta$ -D-グルカンの完全除去を事前に行う煩雑

な操作が伴うこと、②分画操作に伴いアメボサイトライセートの希釈化が起り、必要に応じ濃縮操作を要すること、③操作が加わる毎に各因子の活性低下や画分の損失が伴うこと、④G因子と共にコアギュローゲン(凝固タンパク前駆体)が分離除去されるため、他の因子の再構成により得られる測定法は、「リムルステスト」のうちゲル化現象を利用するゲル化法、比濁法、比濁時間分析法等には適用できず、合成基質法のみ適用できるという使用制限が伴う等の欠点を有する。

本発明者らは、LAL凝固機構のうち、 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ グルカンの関与により凝固(ゲル化)反応が開始する系(G因子活性化系)について詳細に研究を行なっている過程で、これまでG因子の活性化にのみ関与すると考えられた $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ グルカン類のうち、 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ グルコシド構造単位が特定の個数だけ連続して結合している構造部分を含有するものは、全く意外にも、G因子の活性化とは全く逆の阻害作用を示すことを見い出し本発明を完成するに至った。

## 15 発明の開示

かくして、本発明によれば、下記式



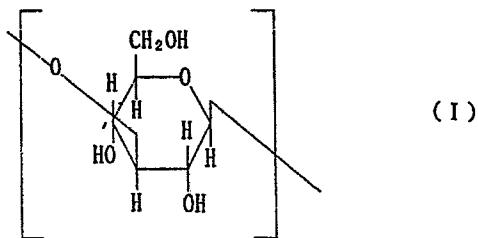
20 で示される $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ グルコシド構造単位(分子量: 162)が連続して2~370個結合したポリ- $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ グルコシド構造部分を少なくとも1つ含有するポリグリコシドを有効成分とするカブトガニ・アメボサイト・ライセートG因子活性化阻害剤が提供され

る。

本発明によればまた、上記ポリグリコシドの有効量を、カブトガニ・アメボサイト・ライセート（LAL）に添加することからなる、LAL中に存在するG因子の活性化を阻害する方法が提供される。

5 以下、本発明についてさらに詳細に説明する。 本発明の阻害剤において有効成分として使用されるポリグリコシドは、下記式

10

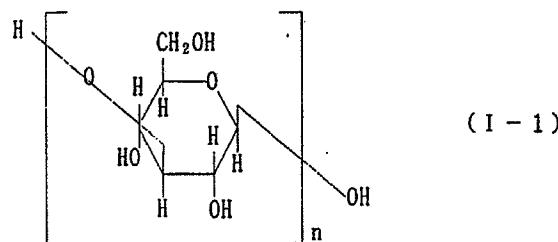


15

で示される  $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$  グルコシド構造単位が連続して 2 ~ 3  
70 個、好ましくは 3 ~ 310 個、より好ましくは 4 ~ 180 個結合した  
ポリ  $- (1 \rightarrow 3) - \beta - D -$  グルコシド構造部分 [以下、便宜上これを「 $\text{ポリ} (1 \rightarrow 3) \text{ グルコシド構造部分}$ 」という] を 1 分子中に少なくとも 1 つ含有するポリグリコシドである。

20

かくして、本発明で使用されるポリグリコシドは、 $\text{ポリ} (1 \rightarrow 3) \text{ グルコシド構造部分}$  を 1 分子中に少なくとも 1 つ含有するものである限り、該ポリグリコシド分子の他の部分の構造は、特に制限はなく広い範囲から選ぶことができる。ただし、他の構造部分はエンドトキシン及びC因子活性化系と実質的に相互作用しないものであることが重要である。例えば、本発明で使用されるポリグリコシドは、実質的に 1 つの  $\text{ポリ} (1 \rightarrow 3) \text{ グルコシド構造部分}$  のみからなるもの、例えば下記式



5 式中、

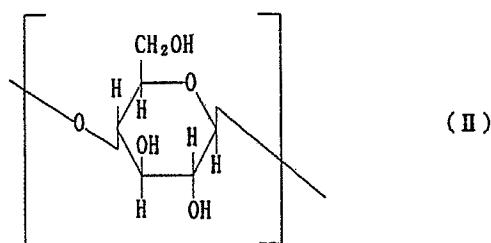
nは2~370、好ましくは3~310、より好ましくは4~18

0の整数である、

で示されるポリ-(1→3)- $\beta$ -D-グルコシドであることができ、

或いは1つのポリ(1→3)グルコシド構造部分に、下記式

10



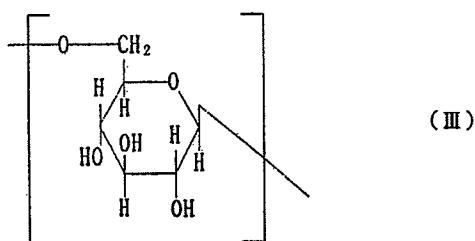
で示される(1→4)- $\beta$ -D-グルコシド構造単位の1つもしくはそ

15 れ以上及び／又は下記式

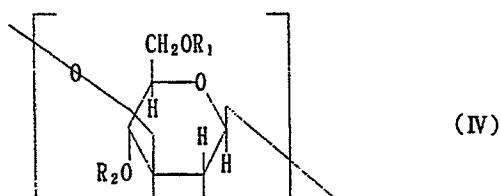
20

で示される(1→6)- $\beta$ -D-グルコシド構造単位の1つもしくはそ

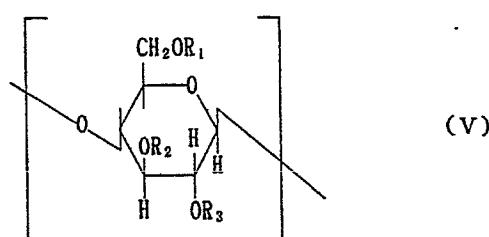
れ以上及び／又は下記式



5



10



15

式 (IV)、(V)、(VI) 中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>の少なくとも 1 つは  
メチル基、ヒドロキシメチル基、カルボキシメチル基、アセチル基、  
硫酸基、リン酸基等化学的に導入し得る官能基およびそれらの金属  
塩、アンモニウム塩及び有機アミン塩から選ばれる残基を表わし、  
そして残りは水素原子を表わす、

20

で示される修飾された β-D-グルコシド構造単位の 1 つもしくはそれ  
以上から構成される糖鎖が結合した [この糖鎖は前記ポリ (1 → 3) グ  
ルコシド構造部分に分岐鎖として結合していてもよい] 構造のものであ  
つてもよい。

さらにまた、本発明で使用するポリグリコシドは、2つ又はそれ以上  
の前記ポリ (1 → 3) グルコシド構造部分が、他の糖鎖構造部分を狭ん  
で下記式

A<sub>1</sub> - B<sub>1</sub> - A<sub>2</sub> - B<sub>2</sub> - · · · · ·

式中、

A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、· · · · · はそれぞれ前記式(I)で示される(1→3)

-β-D-グルコシド構造単位が連続して2~370個、好ましく

5 は3~310個、より好ましくは4~180個結合したポリ-(1

→3)-β-D-グルコシド構造部分を表わし、A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、· · · ·

・の各構造部分を構成する式(I)の単位の数は互に異なっていて

もよく、そしてB<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、· · · · · は各々同一もしくは相異なる

他の糖鎖構造部分を表わす、

10 で示されるように連結した構造のものであつてもよい。ここで、B<sub>1</sub>、

B<sub>2</sub>、· · · · · によつて表わされる他の糖鎖構造部分としては、例え

ば前記式(II)、(III)、(IV)、(V)又は(VI)で示される構造単

位の1個又は2個以上のブロックからなる構造部分が挙げられる。

さらにまた、本発明で使用するポリグリコシドは、前記ポリ(1→3)

15 グルコシド構造部分が、上記B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、· · · · · によつて表わされる

如き他の糖鎖構造を狭んで前記式(I)で示される(1→3)-β-D

-グルコシド構造単位が連続して371個以上結合した長鎖のポリ-(1

→3)-β-D-グルコシド構造部分が連結した構造のものであつても

よい。

20 従つて、本発明で使用されるポリグリコシドは前記ポリ(1→3)グ

ルコシド構造部分を1分子中に少なくとも1つ含有するものである限り、

その分子量は特に制約されるものではないが、水に対する溶解度が低下

したり、粘度が増大することにより取扱が困難となり、エンドトキシン

測定キット調製時の一定品質を得る点等から不利を生ずることがあるの

で、一般には分子量が500,000以下、好ましくは500~240,000、さらに好ましくは650~80,000の範囲内のものが好都合である。

また、本発明で使用されるポリグリコシドは前記のポリ(1→3)グルコシド構造部分を1分子中に少なくとも1つ含有するものから実質的になることが好ましいが、しかし必ずしもそうである必要はなく、例えば、前記式(I)で示される(1→3)- $\beta$ -D-グルコシド構造単位が連続して371個以上結合した高分子量のポリ-(1→3)- $\beta$ -D-グルコシド構造部分を含有する他のポリグリコシドが混在していてもよい。何んとなれば、本発明によるポリグリコシドは、LALのG因子活性化系の開始因子であるG因子に、G因子活性化物質である高分子量のポリ-(1→3)- $\beta$ -D-グルコシドよりも速く強く結合して活性化G因子への活性化を阻害し、かかる高分子量のポリ-(1→3)- $\beta$ -D-グルコシドの存在によってその阻害作用に実質的な影響がないからである。

上記の如く他の成分が混在するポリグリコシドを阻害剤として使用する場合、本発明によるポリグリコシドの阻害剤中における含有量には特に制限はないが、その含有量があまりにも少ないと、G因子の活性化の阻害に多量の該ポリグリコシドを使用することが必要となり不経済であるので、一般には、少なくとも5重量%、好ましくは10重量%以上、さらに好ましくは20重量%以上を占めることが望ましい。

なお、本明細書においてポリグリコシドの分子量は、分子量既知の標準物質を用い下記の条件でゲルバーミエイションクロマトグラフィーを行ない標準曲線を作成し、次に供試試料について同じ条件でクロマトグ

ラフィーを行ない、その結果を標準曲線と対比することにより求めた値である。

カラム：TSKgel G-PWXLシリーズ(東ソ-株式会社)7.8×300mm数種数本

移動相：0.3MNaOH

5 流速：0.5ml/min

試料溶液濃度：0.1-5mg/ml

試料溶液注入量：0.1ml

カラム温度：室温

検出法：示差屈折計(LKB社)による測定又はフェノール硫酸法による

#### 10 糖定量

標準物質：TSK 標準ポリエチレンオキシド(東ソ-株式会社)およびポリエチレングリコール(半井化学薬品株式会社)の重量平均分子量が1,000から860,000の10種を使用。

本発明においてG因子活性化阻害剤として用いられる上記の如き特性をもつポリグリコシドは、天然に由来するものであってもよく、或いは合成されたもの又は前記式(I)で示される(1→3)- $\beta$ -D-グルコシド構造単位を3個以上含有するポリ(1→3)- $\beta$ -D-グルコシドの一部を化学的に修飾したものであつてもよい。通常は天然に由来するものの方が入手容易である。そのようなポリグリコシドの具体例としては以下に記載するものが挙げられる。

(1) 前記式(I)で示される(1→3)- $\beta$ -D-グルコシド構造単位のみから実質的になる実質的に直鎖状のポリグルコシド：例えば、アルカリゲネス属(Alcaligenes)バクテリア由來の(1→3)- $\beta$ -D-グルカン；鞭毛藻(Euglena)由來のパラミロン；高等植物の纖維組織

の $\beta$ -グルカン又は篩管から抽出されるカロース；上記(1→3)- $\beta$ -D-グルカンやLaminaria(コンブ属)、Eisenia(アラメ属)等の褐藻類由来のラミナラン類等の部分水解物中に含まれる高重合度の(1→3)- $\beta$ -結合からなるD-グルコース重合体；ラミナリデキストリン(重合度10~20のもの)、ラミナリオリゴ類(重合度10以下のもの)、等。

- (2) 前記式(I)で示されるポリー(1→3)- $\beta$ -D-グルコシド構造単位と前記式(III)で示される(1→6)- $\beta$ -D-グルコシド構造単位の両者を含有するポリグリコシド：例えば、
- 10 a) (1→3)- $\beta$ -結合からなる主鎖に1~数個の(1→6)- $\beta$ -結合が連鎖したグルコース又はグルコース重合体が組込まれたもの、例えば、Eisenia(アラメ属)褐藻類由来のラミナラン類。
- b) 上記a)の(1→3)- $\beta$ -結合で連鎖したグルコース又はグルコース重合体にさらに(1→3)- $\beta$ -結合の糖鎖が(1→6)- $\beta$ -結合で分岐し、また特に糖鎖の一部に他の糖部分を含みうるもの、例えば、Laminaria(コンブ属)褐藻類由来のラミナラン類、Ochromonas、Phaeodactylum、Skeletonema、Biddulphia、Coscinodiscus、Chaetoceros等の珪藻由来のクリソラミナラン類、Poria(ブクリヨウ菌)由来のバキマン等。
- 15 c) さらに多くの分岐をもち、樹状構造を有するもの、例えばPhytophthoraの細胞壁由来のグルカン、等。

d) (1→3)- $\beta$ -結合よりなる直鎖状グルカンに(1→6)- $\beta$ -結合でグルコースが連結しているもの、例えばグルコース単位3残基当たり1残基の割合で分岐のあるSclerotinia由来のスクレロタン、Schiz

ophyllum (スエヒロタケ) のシゾフィラン、Sclerotium、Corticium、Stromatinia等に由来するスクレログルカン類等。

また、(1→3)- $\beta$ -結合よりなる直鎖状グルカンのグルコース単位5残基当り2残基の割合で(1→6)- $\beta$ -結合でグルコースが結合しているもの、例えば、Lentinus (シイタケ) のレンチナン、等。

e) (1→6)- $\beta$ -結合よりなる直鎖状グルカンのグルコースのC-3位から(1→3)- $\beta$ -結合でグルコース鎖が複数分岐しているもの、例えば、Saccharomyces (パン酵母) の細胞壁由来の $\beta$ -グルカン、等。

(3) 前記式(I)で示される(1→3)- $\beta$ -D-グルコシド構造単位と前記式(II)で示される(1→4)- $\beta$ -D-グルコシド構造単位の両者を含有するポリグリコシド：例えば、Cetraria、Usnea、Evernia等に由来するリヒエナン類、オオムギ胚乳中に含まれる $\beta$ -グルカン等の(1→4)- $\beta$ -オリゴグルコシドが(1→3)- $\beta$ -結合により連結した糖鎖構造からなるもので、所々に(1→3)- $\beta$ -オリゴグルコシド構造を含むもの。

以上に述べたポリグリコシドの或る種のものは市販品として入手することができ、それらはそのまま本発明の阻害剤として利用することができるが、必要に応じて、糖類を部分的に分解し及び／又は分別処理にして、前記式(I)で示される(1→3)- $\beta$ -D-グルコシド構造単位を前記特定量で含有するポリグリコシドに富む画分を調製し、それを本発明の阻害剤に利用してもよい。

かかる糖鎖の部分的分解及び分別処理はそれ自体既知の方法で行なうことができる。例えば、糖鎖の部分分解は酸またはアルカリ、 $\beta$ -グルカナーゼを用いる加水分解、加酢分解、音波処理等により行なうことがで

きる。また分子量分画は、アルコール、アセトン、エーテル等の有機溶媒や塩類を用いる分別沈澱法、分子篩剤や分子篩膜を用いる分画により行うことができる。

また、上記(1)～(3)に例示した如きポリグリコシドは、糖鎖の一部を、  
5 メチル基のようなアルキル基、ヒドロキシメチル基のようなヒドロキシアルキル基、カルボキシメチル基の如きカルボキシアルキル基、アセチル基、硫酸基、リン酸基などの酸基、その他の官能基によつて化学的に修飾されていてもよい。それらはそれ自体既知の方法でかかる官能基を導入することによつて調製することができる〔例えば、(1)安藤、寺山、  
10 西沢、山川編、生化学研究法Ⅰ、284～303(1967)、朝倉書店、(2)Whistler, R. L. ed.; Methods in Carbohydrate Chemistry Ⅲ,  
193～267, 271～331(1964), Academic Press等参照〕。  
特に、G因子活性化作用をもつ分子量が約60,000以上の(1→3)  
15 -β-D-グルカンは部分的な化学的修飾によつて、そのポリ-(1→  
3)-β-D-グルコシド構造部分における前記式(I)で示される(1  
→3)-β-D-グルコシド構造単位の連続結合数を370個以下にすることにより、本発明の阻害剤として使用できるようになる。

しかし、本発明において好適に使用しうるポリグリコシドの具体例を示せば次のとおりである。

- 20 • 分子量342～1,638のラミナリオリゴ糖、
- 分子量1,800～3,258のラミナリデキストリン、
- 平均分子量2,000～60,000の(1→3)-β-D-グルカン、
- 平均分子量3,000～23,000のラミナラン、
- 平均分子量3,000～20,000のスクレオタン、

- ・平均分子量500,000以下のシゾフィラン、
  - ・平均分子量1,100,000以下のレンチナン、
  - ・平均分子量12,000以下のパン酵母グルカン水可溶物、
  - ・平均分子量33,000以下のリヒエナン、
- 5     ・平均分子量200,000以下の大麦 $\beta$ -グルカン、
- ・例えばカードランの部分カルボキシメチル化により得られる平均分子量40,000~240,000の部分カルボキシメチル化(1→3)- $\beta$ -D-グルカンおよびその塩(置換度:0.003~1.0)、
  - ・平均分子量23,000以下の部分カルボキシメチル化ラミナランおよびその塩(置換度:1.0以下)、
- 10    ・平均分子量80,000以下の部分メチル化(1→3)- $\beta$ -D-グルカン(置換度:0.003~1.0)、
- ・平均分子量23,000以下の部分硫酸化ラミナランおよびその塩(置換度:1.0以下)。
- 15    以上に述べた本発明に従うポリグリコシドは、後述する実施例において実証されているように、LAL中に存在するG因子の活性化を強力に阻害する作用を有しているので、リムルステストにおいてG因子活性化系による影響を受けずに検体中のエンドトキシンを特異的に検出測定するためには使用することができる。その使用に際して、G因子活性化阻害剤としてのポリグリコシドは、通常、リムルステストに用いられるLALに対し、該LAL中のG因子の活性化を完全に阻止するのに必要な量以上を①検出測定時に添加するか、②LALに事前に添加するか、③LALの抽出調製時に添加することができる。
- ここでLAL中のG因子の活性化を完全に阻止するのに必要な阻害剤

の量は、例えば、次のようにして決定することができる。

氷冷下、一定量の L A L に、通常の測定条件下において L A L を充分に活性化する一定量の G 因子活性化物質（エンドトキシンを含有しないもの、またできる限り G 因子活性化阻害剤を含まないもの）を加え、これに対して阻害剤（エンドトキシンを含有しないもの）を濃度を変えて加え、通常の L A L 使用時と同条件で反応させる。この条件下で L A L の活性化を 100% 阻害する阻害剤の濃度を求める。

次に、上で求めた濃度の阻害剤を上記の一定量の L A L に加え、更に G 因子活性化物質の量を変化させて加え、どの濃度で加えても L A L が活性化されないことを確認する。

上記の操作で一定量の L A L 中の G 因子の活性化を完全に阻害するのに必要な阻害剤の量（濃度）を求めることができる。

このようにして求めた各種市販のライセートの G 因子活性化を完全に阻止するのに要する G 因子活性化阻害剤の量を示せば次のとおりである。

15

20

表-1

ライセート(商品名)		G I *(ng/mℓ LAL)
プレゲル (生化学工業)		120
プレゲル-S (生化学工業)		120
5 リムルステストワコー (和光純薬)		100
リムルス HS-テストワコー (和光純薬)		100
パイロテル (ケープコッド社)		120
パイロセート (ヘマケム社)		230
パイロテスト (デイフコ社)		230
10 パイロジエント (ウイツテーカー バイオプロダクツ社)		50
パイロディック (生化学工業)		230
トキシカラ (生化学工業)		450
キューシーエル-1000 (ウイツテーカー バイオプロダクツ社)		50
15 コーテスト® エンドトキシン (カビービトラム社)		230

(注) \*G 因子活性化阻害剤：調製例 4-1 で得たカードランギ酸分

解物の G P C 分画画分 4 (表 2 中、試料 N o . 1 4)。

上記表-1 に示す阻害剤の必要量から明らかなように、L A L からなるリムルテスト試薬には、本発明によるポリグリコシドを L A L 1 mℓ 当り少なくとも 50 ng、好ましくは 100 ng 以上、さらに好ましくは 100~230 ng、最も好ましくは 230~500 ng の範囲内で添加するのが適当である。

以下、本発明の G 因子活性化阻害物質の調製法、作用機作、該阻害物

質を用いたリムルステスト試薬、キット等についてさらに詳細に説明する。

#### 図面の簡単な説明

第1図は市販カードランの分子篩(GPC)分画パターンであり、  
5 第2図は第1図中No.44~46画分の再クロマト分画パターンである。

#### [本発明のG因子活性化阻害物質の調製法]

本発明のG因子活性化阻害物質は、例えば、以下の調製例に示す方法により調製できる。また、市販品の(1→3)- $\beta$ -D-グルカンのうち、本発明の範囲にあるものは、そのまま使用することが出来る。  
10

#### 調製例1：市販カードランからの分子篩クロマト分画による調製

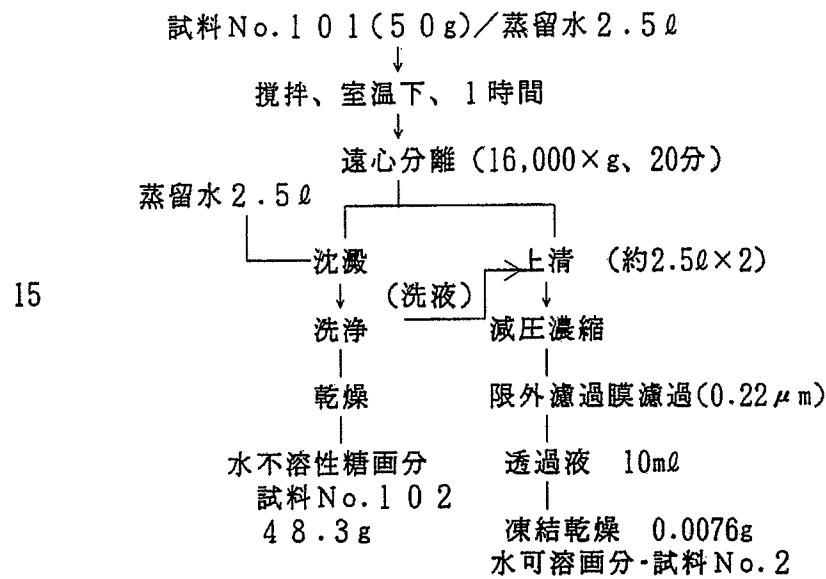
カードラン(和光純薬工業、試薬、Lot No.PEQ 9080、Mn  
>136,000、Mw/Mn>2.76)試料No.101の1gを0.3M  
NaOHに5mg/mlの濃度に溶解して、100μlづつ、室温下、以下の  
15 条件下でゲルパーキュレーションクロマトグラフィー(以下GPC)を行なった。{カラム：TSKgel G6000 PW<sub>xL</sub>とG5000 PW<sub>xL</sub>(ともに7.8×300mm)とを直列に連結、移動相：0.3M NaOH、流速：0.5ml/min}。溶出してきた低分子画分(No.44~46)を採取し、再クロマトグラフィーにかけ、数平均分子量が3,050、多分散度が1.29の試料0.015mgを得た(試料No.1)。上記GPC分画パターンを添付の第1図に示す。更に第1図中No.44~46画分を再クロマトした分画パターンを添付の第2図に示す。

本試料No.1を $\beta$ -1,3-グルカナーゼ(ザイモリエイス-100T、生化学工業製)で消化し、該酵素消化液をGPC(カラム：TSK

gel G 4000 PW<sub>xL</sub>、G 3000 PW<sub>xL</sub>、G 2500 PW<sub>xL</sub>直列；移動相：蒸留水、流速：0.6 mL/min)で分析し、酵素消化液中の糖組成(グルコース40%、ラミナリビオース30%、ラミナリトリオース20%、ラミナリテトラオース8%、ラミナリペンタオース2%、回収率59.4%)が確認出来た。このことから本試料(No.1)の糖構造は(1→3)- $\beta$ -D-グルコシド構造部分を含有する $\beta$ -ポリグルコシドであることがわかる。

#### 調製例2：カードランの水に対する溶解度差による分画

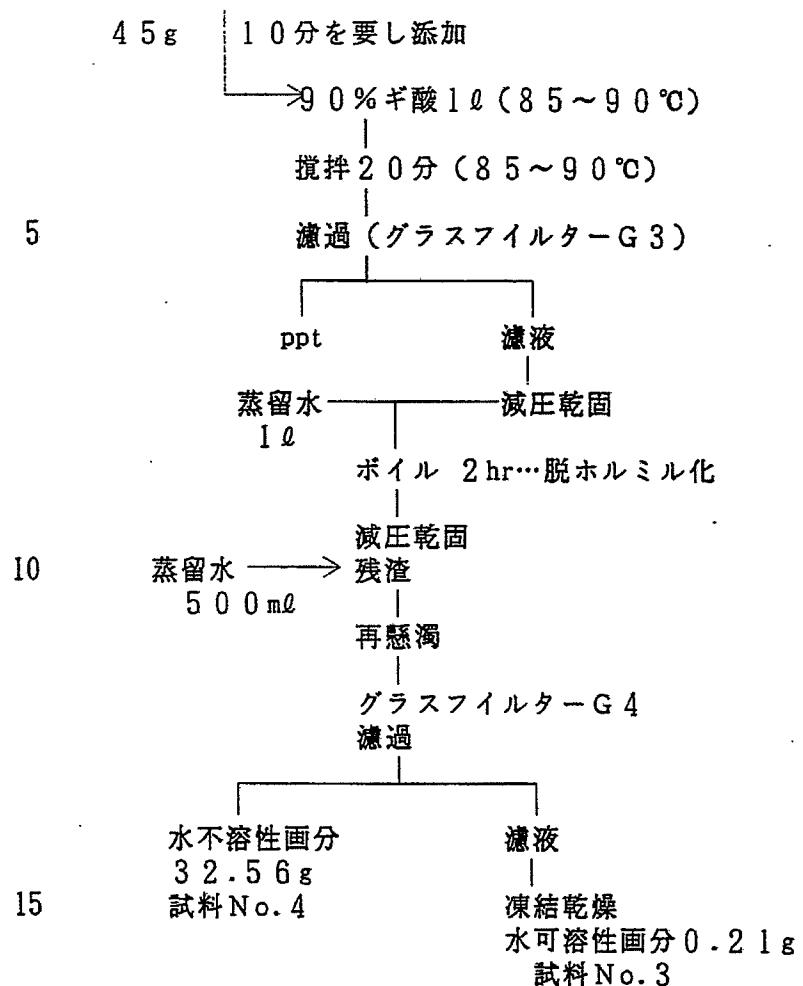
市販カードラン(試料No.101)50gを蒸留水に懸濁し、下記の10フローシートに示す操作により分画を行った。



#### 調製例3：カードラン水不溶性糖画分のギ酸分解による調製

試料No.102の45gをK.Ogawaらの方法[Carbohydr. Res., 29, 397~403(1973)]によりギ酸分解を行った。操作内容を下記のフローシートに示す。

## 試料 No. 102



## 調製例 4-1 : カードランギ酸分解物水可溶性画分の分子篩による再分

## 画

20 先に示した調製例 3 で得た水可溶性画分（試料 No. 3）0.15gを蒸  
留水 30mLに溶解し GPC（カラム：T S K gel G 3000 PW<sub>xL</sub> × 2、  
G 2500 PW<sub>xL</sub> × 1、移動相：蒸留水、流速 0.5 mL/min）により各  
0.5 mL 宛分画採取し、再クロマトにより分子量の異なる 6 種の試料（N  
o. 11～16）を得た。

調製例 4 - 2 : カードランギ酸分解物水不溶性画分の分子篩による再分画

調製例 3 で得た水不溶性画分（試料 No. 4）の 0.2 g を 40 mL の 0.3 M NaOH 溶液に溶解し、GPC（カラム： TSK gel G 3000 P W<sub>xL</sub> × 2、G 2500 P W<sub>xL</sub> × 1、移動相： 0.3 M NaOH 溶液、流速 0.5 mL/min）を用い上記調製例 4 - 1 と同様の操作にて分画、再クロマトを行い溶出液に 0.3 M HCl 溶液を加えて中和し、分子量の異なる 2 種の試料（No. 17 及び 18）を得た。

調製例 5 : カードラン水不溶性画分からの音波処理による試料の調製

試料 No. 102 の 1 g を約 100 mL の 5 mM NaOH 溶液に懸濁し、氷冷下音波発生機、ソニケーター<sup>TM</sup>（大岳製作所、型式 5202 P Z T、東京）により 20 KHz、80 w で 12 分間音波処理により低分子化を行った。

処理液を 5 M NaOH を用い、最終 0.3 M NaOH 溶液とし、上記調製例 4 - 2 に準じクロマト分画を行い分子量の異なる 8 種類の試料（No. 19 ~ 22 及び 103 ~ 106）を得た。

調製例 6 - 1 : 海藻由来の阻害物質の調製 (I)

アラメ (Eisenia bicyclis) 由来の試料は、T. Usuiら Agric. Biol. Chem. 43、603 ~ 611 (1979) の方法に従い市販アラメ乾燥藻体（東京、吹田商店）100 g を粉碎後、80% エタノールにより低分子可溶画分を抽出除去し、残渣から、2% CaCl<sub>2</sub> 水溶液を用いラミナラン画分を抽出する。次いで該抽出液にエタノール 95% を用い終濃度 75% 溶液とし、生じた沈澱を遠沈により集め、エタノール洗浄後、粗ラミナラン試料を得る。該粗試料を蒸留水に再溶解し、陰イオ

ン交換体（D E A E - トヨパール）により夾雜する酸性物質（アルギン酸等）及び色素類を除き、エタノール再沈澱から試料No. 25を得た。

調製例6-2：海藻由來の阻害物質の調製（Ⅱ）

マコンブ Laminaria japonica由來の試料は J. J. Connellら、J. C. hem. Soc., 3494 (1950) の方法に従い、市販マコンブ乾燥藻体(東京、吹田商店) 100gを粉碎後、0.09M HCl溶液にて約3日間静置抽出し、不溶物を濾別し、濾液を更に1日静置し、生ずる少量の沈澱を遠心分離により除去し、上清に3倍容のエタノールを加え、約75%溶液とし、生ずる沈澱を遠沈により集め、アルコール洗浄、乾燥後水溶性ラミナラン画分（試料No. 27）を得た。

調製例7-1：真菌由來の阻害物質の調製（Ⅰ）

真菌 Sclerotinia libertiana由來の試料スクレロタンは、北原ら、岐大農報 8、100~105 (1957) の方法に従って Sclerotinia libertianaの菌核の脱脂乾燥粉末 (30g) を水で充分に抽出して得た残渣を7%NaOH溶液で抽出し、抽出液に10%CuSO<sub>4</sub>溶液を加えて沈澱させ、これを分別して塩酸酸性メタノールで洗浄して銅を除き、80%メタノールで洗浄してHClを除き、メタノール、エーテルで洗浄乾燥することを3回繰返して精製し、6gの試料No. 28を得た。

調製例7-2：真菌由來の阻害物質の調製（Ⅱ）

真菌 Schizophyllum commune：スエヒロタケ由來の試料は、市販シゾフィラン（科研製薬：商品名ソニフィラン、医薬品：Lot No. J 61 040）をK. Tabataら、Carbohydr. Res., 89 121~135 (1981) の方法に従い前記調製例5の操作に準じ、水溶液中10時間音波処理後、アルカリ条件下分子篩分画により分子量の異なる3種類の試

料 (No. 29、30、31) を得た。

調製例 7-3 : 真菌由来の阻害物質の調製 (III)

酵母 Saccharomyces cerevisiae : パン酵母由来の  $\beta$ -グルカン試料は、市販パン酵母グルカン (シグマ社 Lot No. 56F-4027) 9.5 mgに蒸留水 50 mlを加え、室温で 2 時間攪拌後、遠心分離上清約 50 mlを、減圧濃縮により 1 mlとし不溶物を再度遠心除去し、上清から 0.64 mgの試料 (No. 33) を得た。

調製例 8 : 大麦  $\beta$ -グルカン由来の試料の調製

市販大麦  $\beta$ -グルカン (シグマ社、Lot No. 56F-0652) を 10.0.3 M NaOH により 5 mg/mlの溶液とし、前記調製例 4-2 に準じアルカリ条件下、分子篩分画により分子量分布の狭い  $\beta$ -グルカン試料 (No. 36) を得た。

また、上記市販の大麦  $\beta$ -グルカンを 5 mg/mlの濃度にて熱水に溶解し、その遠心 (3,500 rpm、10 分) 上清を前記調製例 4-1 に準じて蒸留水を移動相として 100  $\mu$ l づつ 50 回 GPC 分画採取し、更に同条件下にて再分画採取して分子量の異なる 2 種の試料 (試料 No. 37、38) を得た。

調製例 9 : 部分カルボキシメチル化(1→3)- $\beta$ -D-グルカン (置換度 DS = 0.63) の調製

20 調製例 2 に準じて得たカードラン水不溶物を A. E. Clarke and B. A. Stone: Phytochemistry 1, 175~188 (1962) の方法に従つて、カルボキシメチル化した。即ち、100 g のカードラン水不溶物を窒素気流下 0 °C で 1 l の 5 M 苛性ソーダ水溶液に溶解し、これを攪拌しながら 236 g のモノクロル酢酸を 200 ml の水に溶解したものを滴下

して加え、添加後、60～65°Cで2時間攪拌する。生ずるゲルを2.5倍容のエタノール中で強く攪拌し細粉化し濾過する。70%のエタノールで充分洗滌してからエタノール、エーテル、エーテルで洗滌し乾燥する。このものを水7lに溶解し、1M酢酸で中和し、活性炭40gを5加え、室温で1時間攪拌し、濾過する。濾液を減圧濃縮して1lとし、3倍容のエタノールを加えて沈殿とし、エタノール、エーテルで洗滌し、濃硫酸上減圧乾燥し、113.85gを得た。

得られたカードラン部分カルボキシメチル化(1→3)- $\beta$ -D-グルカンは、D. F. Dursoの硝酸ウラニル法Methods in Carbohydrate Chem. VIII, 127-129 (1980) 参照に従って測定するとエーテル化度(置換度: Degree of Substitution: DS)は0.63であつた。これは糖鎖を形成しているグルコース残基1個当たりの置換し得る水酸基3箇のうちの0.63個が置換されたことを意味するものである。

得られた部分カルボキシメチル化(1→3)- $\beta$ -D-グルカンの2.5mgを5mlの0.1M酢酸アンモニウム水溶液に溶解し、GPC(カラム: トヨバール HW 65 F、5×100cm; 移動相: 0.1M酢酸アンモニウム水溶液; 流速: 5.8ml/min)により分画採取し、別のカラムを用いたGPC(カラム: TSKgel G 6000 PW<sub>xL</sub>+G 5000 PW<sub>xL</sub>+G 3000 PW<sub>xL</sub>を直列に使用; 移動相: 0.1M酢酸アンモニウム水溶液; 流速: 0.6ml/min)により再分画採取し、分子量分布の狭い試料No.41(M<sub>n</sub>=231,000)を得た。

また、部分カルボキシメチル化(1→3)- $\beta$ -D-グルカンの0.3gを蒸留水30mlに溶解し、音波処理(9kHz、180～130W、1時間、音波発生機として久保田製作所、Insonator Model 201M

を使用)により低分子化した後、そのうち4.5mLに0.5mLの1M酢酸アンモニウム水溶液を加えて混和後、上記の試料No.41を得るための操作と同様な操作にて、GPC分画採取およびGPC再分画採取を行い、分子量の異なる2種の試料(No.39、40)を得た。

5 調製例10：置換度1.2の部分カルボキシメチル化(1→3)- $\beta$ -D-グルカンの調製

調製例9によつて得られた置換度(DS)0.63のカルボキシメチル化(1→3)- $\beta$ -D-グルカン10gを窒素気流下0°Cで25mLの10.5M NaOHに加えてペーストとしよく攪拌しながら、それに10 モノクロル酢酸水溶液(10g/12mL)を加え、60°Cに加温し、4時間攪拌し、冷却してから2M HCl 30mLを加え、次いで200mLの塩酸酸性エタノール(40mL HCl/エタノール)中に注いで生ずる沈澱を集め、70%エタノールで洗滌後、エタノール、エーテルで洗滌し、減圧乾燥し、試料No.107の標品を得た。

15 調製例9に示したDS=0.63の部分カルボキシメチル化(1→3)- $\beta$ -D-グルカンと同様の方法で置換度を測定した結果このものはDS=1.20であつた。

調製例11：部分カルボキシメチル化ラミナランの調製

部分カルボキシメチル化ラミナランはLaminaria digitataのラミナラン(シグマ社Lot No.77F-3885)を用い、調製例9の部分カルボキシメチル化法と同様、A. E. Clarke and B. A. Stone: Phytoc hem. 1, 175 (1962)に記載の方法に準じ調製し、試料No.42(DS=0.06)の標品を得た。

調製例12：部分メチル化(1→3)- $\beta$ -D-グルカンの調製

調製例2に準じて得たカードラン水不溶物3.0gをM. Samec, Kolloid-Beihefte 51, 369(1940)の方法に従い、水80mlに懸濁し、窒素気流下、飽和苛性ソーダ水溶液1.35mlを加え、完全に溶解させ、4°Cで、こゝにジメチル硫酸6.0gを徐々に加え、約1時間後、アセトン中に反応液を滴下し、生ずる沈殿を集め、アセトンで充分洗滌し、濃硫酸上減圧乾燥し、標記調製品（試料No.43、DS=0.16）の3.13gを得た。

調製例13：部分硫酸化ラミナランの調製

Laminaria digitata ラミナランの硫酸エステル化はピリジン中でピリジン-3酸化硫黄複合体（和光純薬工業、Lot No. PPL8823）を用いて次の如く行った。

充分に乾燥したLaminaria digitata のラミナラン（シグマ社、Lot No. 77F-3885）0.5gを50mlの脱水ピリジンに溶解し、ピリジン-3酸化硫黄複合体1gを加え、60°Cで1時間反応させ、水100mlを加え、冷却し、苛性ソーダで中和し、あらかじめアルカリ水溶液で充分洗滌してグルカンを除去した透析膜（スペクトロボア1,000カット）を用いて水に対して透析した後、濃縮し、2倍容のアセトンを加えて糖成分を沈殿せしめ、アセトンで洗滌後、濃硫酸上減圧乾燥し、0.38gの標記調製品を得た（試料No.44、DS=0.14）。

なお、調製例12～13に示した各標品のメチル基及び硫酸基の置換度は、下記文献①、②の方法に従い測定算出した。

- ① 落合、津田、阪本；有機定量分析法（微量篇）、南山堂（1956）；
- ② Whistler, R. L. ed., Methods in Carbohydrate Chemistry III, p 229～235, 277～280 (1964), Academic Press

## [市販試料]

下記市販試料は物性を確認後、そのまま又はアルカリ可溶化後中和し、測定に供した。

グルコース：(和光純薬、J I S特級試薬)：試料 No. 108

5 ラミナリオリゴ糖：(生化学工業、ピュア－試薬)：試料 No. 5～10

ラミナラン Eisenia araborea由来：(半井化学、試薬)：試料 No. 23

" E. araborea由来：(東京化成、試薬)：試料 No. 24

" Laminaria digitata由来：(シグマ社試薬)：試料 No. 26

レンチナン Lentinus edodes(シイタケ)由来：(山之内製薬、医薬 Lot  
10 No. C K C 7)：試料 No. 32

リヒエナン Cetraria islandica由来：(シグマ社、試薬)：試料 No.  
34

" Usnea barbata由来：(シグマ社、試薬)：試料 No. 35

実施例 1～44

15 上記の各試料の分子量、G因子活性化阻害力値等の測定結果を下記表  
- 2 に示す。

表 - 2

試料No.	物質名	調製法	糖鎖構造 <sup>1)</sup>		$M_w/M_n$	G因子活性化 (単位/ $\text{mg}$ )
			$M_n^{(2)}$	$M_w/M_n$		
1	カーボランジング分画	調製例1	(1)	3,050	1.29	1,000,000
2	カーボラン水可溶物	調製例2	(1)	3,270	2.49	2,240,000
3	水不溶性画分	調製例3	(1)	2,080	1.90	10,700,000
4	ミミミミミミミミミミ	市販品(生化学工業)	(1)	10,000	3.19	324,000
5	ララララララララララ	市販品(生化学工業)	(1)	342	214	4,670
6	ナナナナナナナナナナ	市販品(生化学工業)	(1)	504	20,000	20,000
7	ナナナナナナナナナナ	市販品(生化学工業)	(1)	667	39,800	39,800
8	ナナナナナナナナナナ	市販品(生化学工業)	(1)	829	55,000	55,000
9	ナナナナナナナナナナ	市販品(生化学工業)	(1)	991	103,000	103,000
10	カーボランジング分画	市販品(生化学工業)	(1)	1,153		
11	GPC分画	調製例4-1	(1)	2,370	1.20	708,000
12	GPC分画	調製例4-1	(1)	3,400	1.20	13,400,000
13	GPC分画	調製例4-1	(1)	4,800	1.20	20,000,000
14	GPC分画	調製例4-1	(1)	5,800	1.20	31,600,000
15	GPC分画	調製例4-1	(1)	6,800	1.20	6,310,000
16	GPC分画	調製例4-1	(1)	9,800	1.22	3,980,000
17	GPC分画	調製例4-2	(1)	14,500	1.24	1,820,000
18	GPC分画	調製例4-2	(1)	27,500	1.26	126,000

19	GPC分画画分1	調製例5	(1)	20,700	1.27	646,000
20	GPC分画画分2	調製例5	(1)	28,300	1.18	389,000
21	GPC分画画分3	調製例5	(1)	50,200	1.26	4,900
22	GPC分画画分4	調製例5	(1)	58,100	1.29	234
23	<u>Eisenia araborea</u> 由来	市販品(半井化学)	(2)a)	16,800	1.49	6,760
24	<u>Eisenia araborea</u> 由来	市販品(東京化成)	(2)a)	11,200	1.55	29,500
25	<u>Eisenia bicyclis</u> 由来	調製例6-1	(2)a)	22,500	1.27	64,600
26	<u>Laminaria digitata</u> 由来	市販品(シグマ社)	(2)b)	5,850	1.16	7,080,000
27	<u>Laminaria japonica</u> 由来	調製例6-2	(2)b)	17,700	3.98	39,800
28	スクレロタン	調製例7-1	(2)d)	16,800	2.77	26,300

表-2(続)

試料 No.	物質名	調製法	糖鎖構造 <sup>1)</sup>	Mn <sup>2)</sup>	Mw/Mn	G 因子活性化 阻害力値 (単位/mg)
29	シソフイラン GPC分画画分1	調製例7-2	(2d)	6,750	3.14	138,000
30	GPC分画画分2	調製例7-2	(2d)	23,600	2.37	11,700
31	GPC分画画分3	調製例7-2	(2d)	27,500	1.49	50,100
32	レンチナン (山之内製薬)	市販品 調製物7-3	(2d)	21,200	2.63	10,000
33	パン酵母グルカン水可溶物 リヒエナン	市販品(シグマ社) 市販品(シグマ社)	(2e)	11,600	5.14	11,500
34	Cetraria islandica由来 <u>Usnea barbata</u> 由来	市販品(シグマ社)	(3)	22,000	4.72	3,550
35	大麦 $\beta$ -グルカン GPC分画画分1	調製例8 調製例8 調製例8	(3) (3) (3)	54,900 129,000 200,000	1.16 1.09 1.13	30,900 11,700 40,700
36	GPC分画画分2	調製例8	(3)	54,900	1.16	30,900
37	GPC分画画分3	調製例8	(3)	129,000	1.09	11,700
38	部分カルボキシメチル化(1→3) - $\beta$ -D-グルカン(DS=0.63)	調製例11	(2b)	200,000	1.13	40,700
39	GPC分画画分1	調製例9	(1)	42,400	1.14	117,000
40	GPC分画画分2	調製例9	(1)	77,300	1.10	91,200
41	GPC分画画分3	調製例9	(1)	231,000	1.10	80,000
42	部分カルボキシメチル化 ラミナラン	調製例11	(2b)	8,170	1.21	3,630,000
43	部分メチル化(1→3)- $\beta$ -D- グルカン	調製例12	(1)	78,200	1.10	93,300
44	部分硫酸化ラミナラン	調製例13	(2b)	10,300	2.04	117,000

101	カードラン	市販品 (和光純業工業)	(1)	136,000<	2.76<	100>
102	カードラン水不溶物 カードラン音波処理物	調製例2	(1)	159,000<	2.50<	100>
103	GPC分画画分5	調製例5	(1)	76,300	1.26	100>
104	GPC分画画分6	調製例5	(1)	92,600	1.23	100>
105	GPC分画画分7	調製例5	(1)	171,000	1.19	100>
106	GPC分画画分8	調製例5	(1)	216,000	1.19	100>
107	部分カルボキシメチル化(1→3) - $\beta$ -D-グルカン(DS=1.20)	調製例10	(1)	329,000<	1.27<	100>
108	グルコース	市販品 (和光純業工業)	180			100>

1) 糖鎖構造の記号は、明細書に記載した分類記号を表わす。

2) グルコースおよびラミナリオリゴ糖は絶対分子量(理論値)。他は別記の分子量  
測定法により求めたポリエチレンオキシドおよびポリエチレンゴール換算値。

試料No. 1 ~ 4 4は本発明のG因子活性化阻害物質。試料No. 101 ~ 108は  
比較のために用いた物質。

表中の分子量は前記ゲルパーキュエイションクロマトグラフィー（以下 GPCと略記することがある）により求めた下式で定義される数平均分子量 ( $M_n$ ) で表し、また、分子量分布は、下式で定義される多分散度 ( $M_w/M_n$ ) で表わす。

$$5 \quad \text{数平均分子量 } (M_n) = \frac{\sum H_i}{\sum (H_i/M_i)}$$

$$\text{重量平均分子量 } (M_w) = \frac{\sum (H_i \times M_i)}{\sum H_i}$$

$$\text{多分散度} = M_w/M_n$$

10 ただし、 $H_i$ はクロマトグラムを時間で等分に多分割したときの i 番目のピーク高さ（試料濃度）を、 $M_i$ は i 番目の分子量を表わす。

G 因子活性化阻害力価は下記に示す [G 因子活性化阻害物質の活性力価測定法] にて測定し mg 当りの単位として示した。

15 [G 因子活性化阻害物質（以下 G I と略記することがある）の活性力価測定法]

反応混合液 200  $\mu l$  中には以下のものを含む。(1) 検体(注 1) G I 試料又は純水 50  $\mu l$

[G 因子活性化物質 (GA と略記、注 2)] 10pg 添加又は無添加  
(2) カブトガニライセート凝固酵素

20 前駆体画分 ( $A_{280} = 2.5$ )(注 3) 30  $\mu l$

(3) カブトガニライセート G 因子画分

( $A_{280} = 0.9$ ) (注 3) 20  $\mu l$

(4) トリス - HCl 缓衝液 (pH 8.0) 20  $\mu$  mole

(5) MgCl<sub>2</sub> 20  $\mu$  mole

(6)Boc - Leu - Gly - Arg - pNA                    0.13  $\mu$  mole

上記反応液を 37 °C で 30 分間インキュベートした後、遊離する pN A の量を 0.04 % 亜硝酸ナトリウム (0.48 M HCl 溶液) 、 0.3 % スルファミン酸アンモニウム、 0.07 % N - 1 - ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩のそれぞれ 0.5 mL を順次加え、 ジアゾカップリングにより色調変換し、 545 nm における吸光度 ( $A_{545}$ ) 量として測定する。

G I 活性は次式により算出する。

$$GI\text{活性}(\%) = 100 - \frac{[GI\text{試料(GA添加)}の} A_{545} - [純水(GA無添加)の} A_{545}]}{[純水(GA添加)の} A_{545} - [純水(GA無添加)の} A_{545}]} \times 100$$

10

この条件下において、 G A による G 因子の活性化を 100 % 阻害する G I 量を 100 単位とする。

(注 1) 検体のうち、水不溶性のものは、 0.3 M NaOH に溶かした後、等容の 0.3 M HCl を加えて中和して用いる。

15

(注 2) 前記調製例 5 で調製したカードラン音波処理物の G P C 分画精製標品 (表 - 2、 No. 106, 分子量 216,000)。

(注 3) 文献 [T. Obayashi et al., Clin. Chim. Acta, 149, 55 ~ 65 (1985)] に従い日本産カブトガニ T. tridentatus から調製した。

20

上記表 - 2 の内容から以下のことが明らかである。

(a) G 因子活性化物質として知られる市販カードラン (試料 No. 101) 中には、水溶性低分子量の G 因子活性化阻害物質が混在している (試料 No. 1, 2)。

(b) (1 → 3) -  $\beta$  - D - グルコシド構造部分から構成されるポリグ

リコシドの(1→3)- $\beta$ -D-グルコシド構造単位の連結個数が2~3  
70の範囲内にあるポリグリコシドは本発明のG因子活性化阻害作用を  
示す。

(c) 阻害活性の認められない高分子量 $\beta$ -グルカン画分（試料No.1  
5 02）から各種低分子化操作により調製して得られた分子量60,000  
0以下の画分がG因子活性化阻害力値を発現した（試料No.3、4、1  
1~22）。

(d) 重合度が10以下のポリ-(1→3)- $\beta$ -D-グルコシド構造部分と  
10 ポリ-(1→4)- $\beta$ -D-グルコシド構造部分とがブロック状に連結している大麦 $\beta$ -グルカン [BallanceらCarbohydr. Res., 61,  
107~118 (1978) 参照] (調製例8、試料No.36、37、  
38)は何れもラミナリテトラオースないしラミナリペンタオース相当  
の活性を示し、グルカン全体の分子量が60,000以下又は以上であ  
つても、本発明の阻害剤として使用できる。

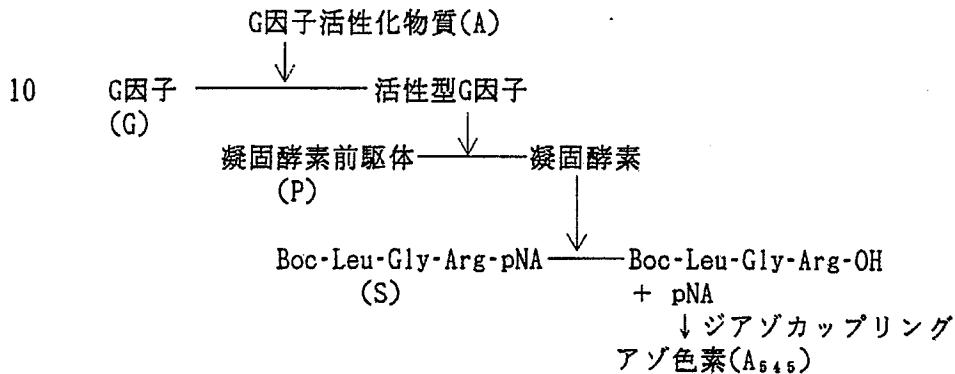
15 (e) 調製例10で得た(1→3)- $\beta$ -D-グルカンの部分カルボキ  
シメチル化したもののうち平均置換度が1.0以上の試料（試料No.1  
07 DS=1.2）ではG因子活性化阻害効果が消失しており、また、  
試料No.26に挙げた高G因子活性化阻害力値を示す試料を部分カル  
ボキシメチル化（調製例11）により(1→3)- $\beta$ -D-グルコシド  
20 部分の鎖長を短縮した場合（試料No.42）及び調製例13の硫酸エ  
ステル修飾により(1→3)- $\beta$ -D-グルコシド構造部分を短縮した  
場合、G因子活性化阻害効果も低減することが併せて確認された。

(f) (1→3)- $\beta$ -D-グルコシド構造部分の重合度が370以上  
を有し、分子量が60,000以上のG因子活性化効果を示す(1→3)

- $\beta$ -グルカンであつても、部分メチル化（調製例12）、部分カルボキシメチル化（調製例9、試料No. 41）により本発明で規定する構造のものとなった場合G因子活性化阻害効果を生ぜしめることが確認できた。

5 [G因子に対する本発明の阻害物質の作用機作]

カブトガニ血液凝固系のうちG因子活性化系は、T.Morita et al., FEBS Letters, 129, 318~321 (1981)により報告されたとおり下記チャートのごとく示される。



15 本発明の阻害物質が上記凝固系のどの部分を阻害するかを明らかにする目的で、次の実験を行った。

反応混合液200 $\mu$ l中には、G因子活性化阻害物質（ラミナリヘプタオース、試料番号10、Iと略記）5 $\mu$ g、G因子活性化物質（カードラン音波処理物G P C分画画分、試料番号106、Aと略記）3pg、文献[T.Obayashi et al.Clin.Chim.Acta, 149, 55~65 (1985)]に従いLALから調製したG因子画分（Gと略記）20 $\mu$ l、凝固酵素前駆体画分（Pと略記）30 $\mu$ l、Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)20 $\mu$ mole、MgCl<sub>2</sub> 20 $\mu$ mole、合成基質Boc-Leu-Gly-Arg-pNA(Sと略記)0.13 $\mu$ moleを含む。

各成分の添加順序および加温条件を変えて、G因子活性化系の活性化阻害の程度を、それぞれの実験（1～5）において、阻害剤無添加時をコントロールとして測定した結果を以下に示す。

	実験内容	コントロールに対する 阻害率 (%)
5	1 $\boxed{G+A+I+P+S} \xrightarrow{37^\circ\text{C}, 10\text{min}}$ $0^\circ\text{C}$	100
	2 $\boxed{G+A+I} \xrightarrow{37^\circ\text{C}, 30\text{min}} + P+S \xrightarrow{37^\circ\text{C}, 3\text{min}}$ $0^\circ\text{C}$	100
10	3 $\boxed{G+I} \xrightarrow{37^\circ\text{C}, 10\text{min}} + A \xrightarrow{37^\circ\text{C}, 10\text{min}} + P+S \xrightarrow{37^\circ\text{C}, 10\text{min}}$ $0^\circ\text{C}$	100
	4 $\boxed{G+A} \xrightarrow{37^\circ\text{C}, 30\text{min}} + I \xrightarrow{37^\circ\text{C}, 10\text{min}} + P+S \xrightarrow{37^\circ\text{C}, 10\text{min}}$ $0^\circ\text{C}$	1.7
15	5 $\boxed{G+A+P} \xrightarrow{37^\circ\text{C}, 30\text{min}} + I \xrightarrow{37^\circ\text{C}, 10\text{min}} + S \xrightarrow{37^\circ\text{C}, 3\text{min}}$ $0^\circ\text{C}$	0

実験1、2、3から明らかなるごとく、G因子（前駆体）に本発明の阻害物質（I）を添加した場合、G因子活性化物質（A）の存在の有無にかかわらず、G因子の活性化は100%阻害される。

一方、実験4、5から明らかなごとくG因子が（A）により一旦活性化された後は阻害物質（I）を共存せしめても活性型G因子の阻害は起らない。

従って本発明の阻害物質（I）は、G因子（前駆体）のみに作用する物質といえる。

尚、LAL中に存在するG因子の活性化を100%阻害する量の本発明の阻害物質（I）があれば、如何に活性化物質（A）の量を多量存在

せしめても、G因子の活性化は生じない。しかし、G因子を100%阻害し得ない少量の阻害物質(I)の存在下に活性化物質(A)が多量存在せしめた場合は、阻害物質(I)により阻害されなかったG因子が活性化物質(A)により活性化されることも確認出来た。

5 このことにより、A.Kakinumaらが、Biochem.Biophys.Res.Commun. 101, 434~439 (1981) に指摘した、(1→3)- $\beta$ -D-グルカン誘導体や、T.MoritaらがProg. Chim. Biol. Res., 189, 53~64 (1985) に示した各種 $\beta$ -グルカンによるカブトガニG因子活性化能における最大活性化濃度の存在を解析出来た。

10 実施例45：G因子活性化阻害物質添加、非添加キットのエンドトキシン特異的測定能比較

本発明のG因子活性化阻害物質をLAL-Testに添加した場合及び添加しなかった場合のエンドトキシン特異性比較を次の操作により、各種検体を用いて行った。

15 用いたLAL-Testの商品は、次の構成からなるトキシカラーテスト<sup>TM</sup>（比色法、生化学工業製）である。

①過塩素酸、②水酸化ナトリウム、③緩衝液、④ライセート+発色合  
成基質、⑤エンドトキシンフリー蒸留水、⑥エンドトキシン標準品、  
⑦塩酸、⑧亜硝酸ナトリウム、⑨スルファミン酸アンモニウム、⑩N-  
20 (1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩。

上記キット構成のうち、③緩衝液にG因子活性化阻害物質として試料No.13を5 $\mu$ g/mlの濃度で溶解した溶液を用いて④のLAL反応主剤を溶解した反応液群(A-キット)及び該阻害物質を含まない緩衝液③を用いて④を溶解した反応液群(B-キット)として、各種検体に対

するA、B両キットの反応性を比較し、下記表-3に示す。

5

10

15

20

表-3: G因子活性化阻害物質添加、非添加キットの  
エンドトキシン特異性比較

No.	検体名	試料 0.1mℓ中の量	反応性( $\Delta A_{545}/30分$ )	
			A - キット	B - キット
1.	エンドトキシン (E T,注1)	2.5pg 5.0pg	0.447 0.895	0.448 0.894
2.	G因子活性化物質 (注2)	3.0pg 100ng	0.000 0.001	0.232 1.5<
3.	G因子活性化物質 + E T	3.0pg + 2.5pg	0.447	0.678
4.	透析膜洗液(注3)	8.0pg	0.001	0.312
5.	透析膜洗液 + E T	8.0pg + 2.5pg	0.446	0.757
6.	臨床検体	血漿として		
a	(注4)	0.017mℓ	0.003±0.002	0.008±0.004
b	(同上)		0.265	0.272
c	(同上)		0.261	0.266
d	(同上)		0.213	0.210
e	(同上)		0.131	0.138
f	(同上)		0.101	0.107
g	(同上)		0.073	0.071
h	(同上)		0.000	1.166
i	(同上)		0.000	0.904
j	(同上)		0.003	0.304
k	(同上)		0.001	0.203
l	(同上)		0.004	0.152
m	(同上)		0.007	1.5<
n	(同上)		0.006	1.5<
o	(同上)		0.006	1.5<
p	(同上)		0.003	1.5<
q	(同上)		0.005	1.5<
r	(同上)		0.004	1.5<

注1: Escherichia coli 0111:B4 由来エンドトキシン(ディフコ社)

注2: カードラン水不溶性画分; 分子量159,000以上; 表2、No.102

注3: 再生セルロース膜であるキュプラアンモニウムレーヨン膜で製造されたホローファイバー型血液透析器AM-Neo-3,000(旭メディカル(株)製)に蒸留水を灌流させ洗浄した洗液。糖含量はフェノール硫酸法で測定した。

注4：健常者25名の平均±標準偏差

検体b~e：敗血症の合併が疑われ、血液培養により、Escherichia coliが検出された

f、g：同上で、Pseudomonas aeruginosaが検出された

i：同上で、Candida albicansが検出された

j：同上で、Candida guilliermondiiが検出された

h：肺アスペルギルス症

k、l：剖検時に全身性真菌感染症と診断された例

m~r：再生セルロース膜であるキュプラアンモニウムレーヨン膜で製造されたホローファイバー型血液透析器により透析を受けた慢性腎不全患者(微生物による感染は無し)

5

検体No.1～5は、トキシカラーテストの測定マニュアルに従い検体を溶媒にそのまま溶解し、その0.1mLを試料として反応を行い、また検体No.6(a～r)は、T.Obayashiの方法[J.Lab.Clin.Med.,  
104, 321～330(1984)]に従って、上記キット構成①、  
②を用い血漿検体を前処理した後その0.1mLを試料として反応に供した。

10

A、B両キットの反応性は、各検体を、キット構成③、④を用いて調製した反応液に加え、37°C、30分間反応せしめ、生ずるpNAを⑦～⑩のカップリング試薬にて発色せしめ545nmの吸光度値で示した。

尚、本キット組成の場合の最大反応性は

$\Delta A_{545} = 1.5$ であった。

15

表-3から判るように、本発明のG因子活性化阻害物質を含むA-キットならびに従来品B-キットとともに、エンドトキシン検体(No.1)に対し、同一の反応性を示す結果であったが、G因子活性化物質であるカードラン水不溶性画分(検体No.2)は、B-キットにおいて、極めて高度の反応性を示した。一方、A-キットにおいて該検体は反応性がまったく示さなかったものの、エンドトキシンと併せた場合(検体No.3)は検体No.1のエンドトキシンと同一の反応性を示した。

20

リムルステスト陽性物質(非エンドトキシン性)として知られている

セルロース系透析膜水洗液

[F.C.Pearson et al., Artif. Organs, 8, 291～298(1984)]を検体(No.4、No.5)として用いた場合の結果も、A-キット、B-キットとともに上記カードラン水不溶性画分および/またはエンドトキシン添加の場合の挙動と同様の結果が示された。

以上の結果により、本発明のG因子活性化阻害剤をLALと併用することは、エンドトキシン特異的測定を可能とすることが判る。

更に従来のLAL-Testで、真のエンドトキセミアか否か、明確に判定出来ないとされた臨床血液検体について、本発明によるA-キット  
5 と従来品のB-キットの比較により、菌培養の結果、グラム陰性菌の存在が確認された検体(No.6; b~g)においてはA、B両キットとともに高い反応性が示されたが、一方、(1→3)- $\beta$ -D-グルカンを菌体細胞壁に有することが知られている真菌の存在が確認された検体(同:  
10 h~l)においては、A-キットでの反応性が示されず、B-キットに高い反応性が示された。また、臨床症状からはエンドトキセミアとは見なされない血液透析患者(慢性腎不全)の検体(同:m~r)においてもA-キットでの反応性は見られず、B-キットでの異常高値は透析膜由來の  
(1→3)- $\beta$ -D-グルカンによるものであることが予測された。

LAL-Testと本発明のG因子活性化阻害剤との組合せにより、上記検体のごときエンドトキシンの存在の有無が明確でない感染症、敗血症を疑われている臨床検体を測定することは、真のグラム陰性菌感染症(エンドトキセミア)を的確に判別出来る利点に加えるに、真菌感染症を判別出来ることから、感染菌タイプの早期判定による該感染菌への適切な治療薬剤の選択、処置、並びにその治療効果の解析を可能とし、本発明の阻害剤を含むキットの提供は診断、医療等医学の進歩に多大の寄与が期待出来る。

以下に参考例として、本発明のG因子活性化阻害物質とカブトガニ・アメボサイト・ライセートの組合せによるエンドトキシン特異的検出測定用キットの調製例を示す。

参考例 1 : G因子活性化阻害剤を市販あるいは既存リムルステスト試薬に、そのエンドトキシン測定時に添加することにより、エンドトキシン特異的測定キットとする方法

1 - 1. リムルステスト試薬（凍結乾燥品）は常法通り、指定された  
5 溶解液（蒸留水または緩衝液）で溶解し、これに本発明のG因子活性化  
阻害剤を検体と同時あるいは別々に添加する（添加順は問わない）こと  
によって目的を達成する方法：

例えば、「プレゲル S」（凍結乾燥品；ゲル化法リムルステスト製品；  
10 生化学工業（株））に蒸留水 0.1 mL を加えて溶解し、該阻害剤（カーボービー<sup>TM</sup>ランのギ酸分解物の GPC 分画画分 4；表 2、No. 14）の水溶液（1.2 μg/mL）0.01 mL  
(120 μg/mL LAL) と検体 0.1 mL とを加えて静かに振り混ぜ、  
37 °C で 60 分間静置加温する時、エンドトキシンのみと反応し、ゲル  
を形成する。

15 1 - 2. リムルステスト試薬溶解液にあらかじめ該阻害剤を溶解し、こ  
れを用いてリムルステスト試薬を溶解することによって目的を達する方  
法：

例えば、「コーテスト・エンドトキシン」（合成基質法リムルステス  
ト製品；カービービートラム社）を使用する場合は、LAL（凍結乾燥品）  
20 1 バイアルを、あらかじめ該阻害剤（ラミナラン；表 2 中、No. 26）  
0.7 μg を溶かした蒸留水 1.4 mL で溶解する。その 0.1 mL (500 n  
g/mL LAL) に検体 0.1 mL を加えて 37 °C、10 分間加温し、合成  
基質 (S-2423) 含有緩衝液 0.2 mL を加えて 37 °C、3 分間加温  
する時、エンドトキシンのみと反応し、黄色を呈する。定量に際しては、

50%酢酸溶液を200μl添加し、405nmで吸光度を測定する。

参考例2：G因子活性化阻害剤をLALに事前に添加することにより、エンドトキシン特異的リムルステスト試薬キットとする方法

2-1. 市販のLAL（いわゆるゲル化法リムルステスト試薬）に事前に該阻害剤を添加することによって、目的を達する方法：

例えば、「リムルスHS-テストワロー」（凍結乾燥品；ゲル化法リムルステスト製品；和光純薬工業（株））を使用して比濁時間分析法により測定する場合は、LAL（凍結乾燥品）1バイアルを、あらかじめ該阻害剤（カードランギ酸分解物のGPC分画画分4；表2中、No.14) 0.5μgを溶かした蒸留水5mlで溶解する。その0.1ml(100ng/mlLAL)を反応用試験管に分注し、さらに検体0.1mlを加えて、静かに振り混ぜ、比濁時間分析装置「トキシノメーターET-201」（和光純薬工業）の専用アナリシスマジュール(37°C)の所定の測光位置にセットし、スタートスイッチを入れる。エンドトキシンのみが反応し、ゲル化時間が表示される。

2-2. あらかじめ調製したLALに検体添加前に該阻害物質を添加することによって目的を達する方法：

例えば、LALを用いて比濁法により測定する場合は、カブトガニ(Tachypleus tridentatus)の血球から低張緩衝液を用いて抽出されたライセート0.1mlに該阻害剤(ラミナラン；表2中、No.26)を1ml当り0.5μg溶かした1M Tris-HCl-1M MgCl<sub>2</sub>緩衝液(pH 8.0)溶液0.01ml(50ng/mlLAL)を加える。これに検体0.1mlを加えて、37°Cで加温する。エンドトキシンのみが反応し、白濁する。経時的に660nmで吸光度を測定すれば定量

できる。

参考例 3 : G 因子活性化阻害剤を L A L の抽出調製時に添加することにより、エンドトキシン特異的リムルステスト試薬原料ライセートを製造する方法

たとえば、カブトガニ (Tachypleus tridentatus、T. gigas、Limulus polyphemus、Carcinoscorpius rotundicauda のどれでもよい) の血リンパ液を採取し、遠心分離して血球 (約 20 g) を得、これに 2. 0 mg/ℓの該阻害剤 (部分カルボキシメチル化ラミナラン ; 表 2 中、N o. 42) を蒸留水または 0.02 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) のような低張緩衝液に溶解した該阻害剤溶液 100 mLを加えて、ワーリング・ブレンダーでホモゲナイズした後、遠心分離 (8,000 rpm; 30 分間; 4 °C) により上清と沈澱物に分画する。この操作をもう一度繰り返し、上清合計約 150 mLを L A L として得る。この L A L の一定量を従来法で抽出された L A L の代わりに用いてリムルステスト試薬 (ゲル化法、比濁法、比濁時間分析法、合成基質法) を調製するとき、エンドトキシンにのみ特異的に反応するエンドトキシン特異的リムルステスト試薬を製造することができる。

なお、合成基質法エンドトキシン特異的リムルステスト試薬の製造法としては、たとえば米国特許第 4,495,294 号明細書 (Method for determining bacterial endotoxin and kit therefor) で開示されている基質ならびに R - Ile - Glu - Ala - Arg - pNA、methoxy carbonyl - D - hexahydroxytyrosyl - Gly - Arg - pNA · AcOH 等の基質を使用すれば、高感度の試薬が製造できる。ここで、R はアセチル基、α - N - ベンゾイル基、α - N - カルボベンゾキシ基、N - tert - ブト

キシカルボニル基、p-トルエンスルホニル基、その他アミノ酸N端保護基を表わす。

一例を示すと、ライセート0.04mlにMgCl<sub>2</sub> 1.5 μgおよび合成基質(N-tert-ブトキシカルボニル-Leu-Gly-Arg-p-ニトロアニリド)4.0 μgを加えて凍結乾燥することによって製造することができる。この凍結乾燥品に0.2M Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)0.1mlおよび検体0.1mlを加えて37°C、30分間加温する時、エンドトキシンのみと反応し、黄色を呈する。また、ゲル化法、比濁法、比濁時間分析法のためのLAL試薬は、ライセート0.1mlにMgCl<sub>2</sub> 10 0.0 μgを加えて凍結乾燥することによって製造することができる。この試薬を参考例1-1、2-1、2-2と同様にして測定するとき、エンドトキシンのみと反応する。

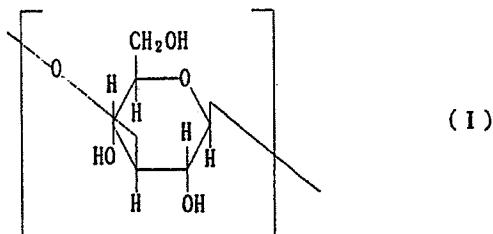
#### 産業上の利用可能性

以上述べたとおり、本発明のG因子活性化阻害剤は、LALと組合わせることにより、エンドトキシン特異的LAL-Testを提供し、エンドトキシンの存在の有無が明確でない感染症、敗血症を疑われている臨床検体を測定するときに特に有用であり、真のグラム陰性菌感染症(エンドトキセミア)を的確に判別出来る利点に加えるに、従来のLAL-Testを併用することにより真菌感染症を判別出来ることから、感染菌タイプの早期判定による該感染菌への適切な治療薬剤の選択、処置、並びにその治療効果の解析を可能とし、本発明の阻害剤を含むキットの提供は診断、医療等医学の進歩に多大の寄与が期待できる。

## 請求の範囲

## 1. 式

5



10

で示される  $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$  グルコシド構造単位が連続して 2 ~ 3  
70 個結合したポリ  $- (1 \rightarrow 3) - \beta - D -$  グルコシド構造部分を少な  
くとも 1 つ含有するポリグリコシドを有効成分とするカブトガニ・アメ  
ボサイト・ライセート G 因子活性化阻害剤。

15

2. ポリ  $- (1 \rightarrow 3) - \beta - D -$  グルコシド構造部分が、式 (I) で  
示される  $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$  グルコシド構造単位が連続して 3 ~ 31  
0 個結合したものからなる請求の範囲第 1 項記載の阻害剤。

15

3. ポリ  $- (1 \rightarrow 3) - \beta - D -$  グルコシド構造部分が、式 (I) で  
示される  $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$  グルコシド構造単位が連続して 4 ~ 18  
0 個結合したものからなる請求の範囲第 1 項記載の阻害剤。

4. ポリグリコシドが分子量 342 ~ 1,638 のラミナリオリゴ糖  
である請求の範囲第 1 項記載の阻害剤。

20

5. ポリグリコシドが分子量 1,800 ~ 3,258 のラミナリデキス  
トリンである請求の範囲第 1 項記載の阻害剤。

6. ポリグリコシドが平均分子量 2,000 ~ 60,000 の  $(1 \rightarrow 3)$   
 $- \beta - D -$  グルカンである請求の範囲第 1 項記載の阻害剤。

7. ポリグリコシドが平均分子量 3,000 ~ 23,000 のラミナラ  
ンである請求の範囲第 1 項記載の阻害剤。

8. ポリグリコシドが平均分子量3,000～20,000のスクレロタンである請求の範囲第1項記載の阻害剤。
9. ポリグリコシドが平均分子量500,000以下のシゾフィランである請求の範囲第1項記載の阻害剤。
- 5 10. ポリグリコシドが平均分子量1,100,000以下のレンチナンである請求の範囲第1項記載の阻害剤。
11. ポリグリコシドが平均分子量12,000以下のパン酵母グルカン水可溶物である請求の範囲第1項記載の阻害剤。
12. ポリグリコシドが平均分子量33,000以下のリヒエナンである請求の範囲第1項記載の阻害剤。
- 10 13. ポリグリコシドが平均分子量200,000の大麦 $\beta$ -グルカンである請求の範囲第1項記載の阻害剤。
14. ポリグリコシドが平均分子量40,000～240,000の部分カルボキシメチル化(1→3)- $\beta$ -D-グルカンおよびその塩(置換度: 0.003～1.0)である請求の範囲第1項記載の阻害剤。
- 15 15. ポリグリコシドが平均部分23,000以下の部分カルボキシメチル化ラミナランおよびその塩(置換度: 1.0以下)である請求の範囲第1項記載の阻害剤。
16. ポリグリコシドが平均分子量80,000以下の部分メチル化(1→3)- $\beta$ -D-グルカン(置換度: 0.003～1.0)である請求の範囲第1項記載の阻害剤。
- 20 17. ポリグリコシドが平均分子量23,000以下の部分硫酸化ラミナランおよびその塩(置換度: 1.0以下)である請求の範囲第1項記載の阻害剤。

18. 請求の範囲第1項記載のポリグリコシドの有効量を、カブトガニ・アメボサイト・ライセートに添加することからなる該カブトガニ・アメボサイト・ライセート中に存在することがあるG因子の活性化を阻害する方法。

5 19. 請求の範囲第1項記載のポリグリコシドの有効量を含有するエンドトキシンに特異的なリムルステスト試薬。

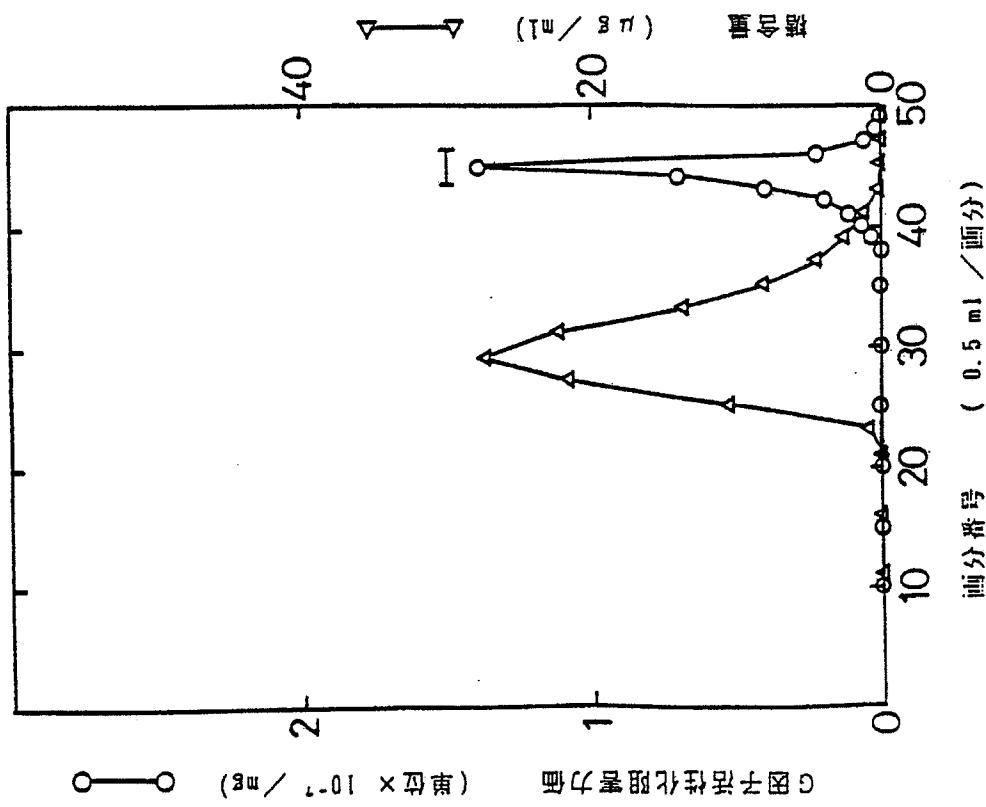
20. 請求の範囲第1項記載のポリグリコシドを、カブトガニ・アメボサイト・ライセート1ml当たり少なくとも50ng含有するエンドトキシンに特異的なリムルステスト試薬。

10

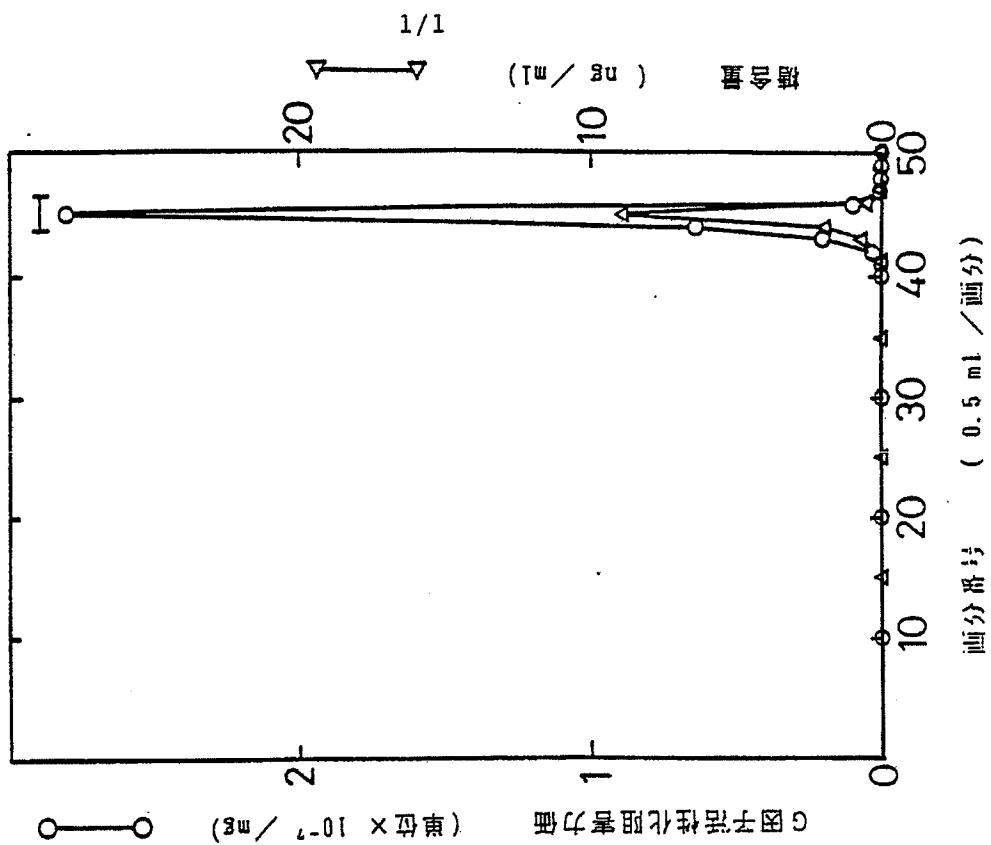
15

20

第1回



第2回



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP89/00903

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl<sup>4</sup> G01N33/579

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>

Classification System	Classification Symbols
IPC	G01N33/579

Documentation Searched other than Minimum Documentation  
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>

Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1989  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1989

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup>

Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
A	Clinica Chimica Acta, Vol.149, No.1(1985) T. Obayashi et al. [A new chromogenic endotoxin specific assay using recombinant limulus coagulation enzymes and its clinical applications] p.55-65	1 - 20
A	FEBS LETTERS, Vol.129, No.2(1981) T. Morita et al. [A new(1→3)-B-D-glucan-mediated coagulation pathway found in limulus amebocytes] p.318-321	1 - 20
A	Journal of Protein Chemistry, Vol.5, No.4 (1986), S. Iwanaga et al. [The hemolymph coagulation system in invertebrate animals] P.255-268	1 - 20
A	JP, A, 58-13517 (Seikagaku Kogyo Co., Ltd.) 26 January 1983 (26. 01. 83) (Family : none)	1 - 20
A	JP, A, 59-28474 (Seikagaku Kogyo Co., Ltd.) 15 February 1984 (15. 02. 84) (Family : none)	1 - 20

- \* Special categories of cited documents: <sup>10</sup>
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search Date of Mailing of this International Search Report

November 13, 1989 (13. 11. 89)

November 27, 1989 (27. 11. 89)

International Searching Authority

Signature of Authorized Officer

Japanese Patent Office

## 国際調査報告

国際出願番号PCT/JP89/00903

## I. 発明の属する分野の分類

国際特許分類(IPC) Int. CL<sup>4</sup>

G01N33/579

## II. 国際調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料

分類体系	分類記号
IPO	G01N33/579

最小限資料以外の資料で調査を行ったもの

日本国实用新案公報 1971-1989年

日本国公開実用新案公報 1971-1989年

## III. 関連する技術に関する文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	Olinica Chimica Acta, 第149巻, 第1号(1985) T. Obayashi et al. [A new chromogenic endotoxin specific assay using recombinant limulus coagulation enzymes and its clinical applications] P, 55-65	1-20
A	FEBS LETTERS, 第129巻, 第2号(1981) T. Morita et al. [A new(1→3)-B-D-glucan-mediated coagulation pathway found in limulus amebocytes], P, 318-321	1-20
A	Journal of Protein Chemistry, 第5巻, 第4号,(1986), S. Iwanaga et al, [The hemolymph Coagulation system in invertebrate animals] P, 255-268	1-20

## \*引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献  
 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリーの文献

## IV. 認証

国際調査を完了した日 13.11.89	国際調査報告の発送日 27.11.89
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 秋月 美紀子 2G7906

## 第2ページから続く情報

	(第Ⅲ欄の続き)	
A	JP, A, 58-13517 (生化学工業株式会社) 26. 1月. 1983 (26. 01. 83) (ファミリーなし)	1-20
A	JP, A, 59-28474 (生化学工業株式会社) 15. 2月. 1984 (15. 02. 84) (ファミリーなし)	1-20

V.  一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI.  発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1.  追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2.  追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_

3.  追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_

4.  追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかつた。

追加手数料異議の申立てに関する注意

追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。

追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかつた。